

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390405

研究課題名（和文）活性化髄核細胞移植療法による椎間板変性抑制・細胞保存法の確立と安全性の検討

研究課題名（英文）Disc repair with transplantation of activated nucleus pulposus cells-how to preserve the cells and its safety-

研究代表者

持田 讓治（MOCHIDA JOJI）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30129697

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、活性化された髄核細胞あるいは髄核組織を長期間保存した際の、細胞活性の維持と安全性を確立することである。ビーグル犬成犬とヒト検体のそれぞれを用い、髄核組織を非凍結群、酵素処理後の細胞凍結群、組織凍結群の3つの群に分け検討した。非凍結群と比べ、細胞増殖能、基質合成能に全群間に有意差が全く認められなかった。以上より、髄核細胞凍結による活性化髄核細胞を用いた変性椎間板の治療の実現性が高いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to evaluate the safety and property of the activated nucleus pulposus cells after the cryopreservation. With the animal model and human material, we compared safety and property of the nucleus pulposus cells, ordinarily activated, to those in two subgroups on cryopreservation method: 1) activated nucleus pulposus cells after cryopreservation for two weeks and 2) nucleus pulposus tissue itself after cryopreservation for two weeks. There was no significant difference amongst those three subgroups on the safety, the proliferation of the nucleus pulposus cells or the potentiality for the cell matrix in both animal and human materials. We confirmed cryopreservation of the nucleus pulposus is useful to repair various disc lesions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：髄核細胞、骨髄間葉系幹細胞、凍結保存、椎間板移植、変性抑制

1. 研究開始当初の背景

（1）東海大学整形外科では、骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化された椎間板髄核細胞を中等度変性がみら

れる椎間板内に移植し、その後の当該椎間板変性進行を抑制する実験系を確立した。すなわち、小、中、大型動物を用いた *in vitro* 並びに *in vivo* の実験で、骨髄間葉系幹細胞が

椎間板髄核細胞を活性化することが示され、また、活性化された椎間板髄核細胞を変性椎間板内に移植したところ、椎間板変性の進行が明らかに抑制された。

(2) ヒト椎間板髄核細胞が実験動物で示されたと同様に同一個体の骨髄間葉系幹細胞によって活性化されるか否かを検討した。実験動物とは性状がやや異なるヒト椎間板髄核細胞も、骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養によって良好な活性化を得ることが示された。

(3) この結果を経て、本学医の倫理委員会に活性化椎間板髄核細胞の変性椎間板内移植療法に関する申請を行い承認された。さらに、本細胞移植療法が、間葉系幹細胞によって体外で操作を受ける過程を含むために、厚生労働省ヒト幹細胞の臨床研究に関する指針に従い、厚生労働省審査委員会に臨床研究の実施を申請し、2008年1月に承認を受けた。2009年2月から臨床研究が開始され、2011年9月に予定された全10例への移植術が終了し、現在経過観察中である。

(4) 厚生労働省から承認された臨床研究の対象は、20歳代で腰椎椎間板変性のために1椎間に固定術が行われる症例で、その隣接椎間板にすでに中等度の変性が見られる症例である。椎体間固定術で摘出された椎間板から得られた髄核細胞を、同一患者の腸骨から採取した骨髄液を分散して得られる骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化し、変性した隣接椎間板内に移植する臨床研究である。一方、変性椎間板への活性化髄核細胞の移植には、活性化した髄核細胞を患者の椎間板が変性進行した時点で移植することが、本細胞移植療法の大きな流れの中で重要な部分となることが予測される。このため、すでに種々の点で確立されている『骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化された髄核細胞』を長期間保存し、しかるべき時期に変性椎間板内に移植する場合の、細胞活性の維持と安全性を確立することが必要となった。このような背景のもと、本研究計画が策定された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、活性化椎間板髄核細胞を用いた椎間板再生医療の臨床応用を拡大するために、移植に用いる髄核細胞の活性化の時期ならびに髄核細胞の保存法を検討することである。具体的には、凍結法の差による再解凍後の髄核細胞数、1髄核細胞あたりのDNA活性、PG活性の状態、細胞接着因子の解析による髄核性状の変化、髄核を構成する多起源の細胞の中でどの細胞が維持可能であるかなどについて、大型動物ならびにヒト椎間板髄核細胞を用いて *in vitro* に検討する。さらに凍結前活性化髄核細胞との相違点を

分析し、変性椎間板への移植を行う上での活性化完成直後の髄核細胞と凍結後髄核細胞の各々の利点、欠点について検討する。さらに凍結後ヒトの活性化髄核細胞については、凍結及び解凍操作による染色体異常や腫瘍化発現の有無についても再確認を行う。さらに、培養環境による髄核細胞活性化の差についても検討する。

3. 研究の方法

(1) ビーグル犬の細胞を用いた実験

・10~13ヶ月齢のビーグル成犬から摘出した髄核細胞 (n=20) と腸骨より得た骨髄液 (n=20) を使用。

・髄核組織を a) 非凍結群、b) 酵素処理後の細胞凍結群 (凍結期間2週間)、c) 組織凍結群 (凍結期間2週間) に3等分

髄核細胞に対する酵素処理法 (TrypleLE、D MEM/F-12培地各々10mlにて1時間攪拌酵素処理)、コラゲナーゼIの20mlにて2時間の酵素処理)

・骨髄処理 5%デキストランによる比重分離を行い骨髄間葉系幹細胞を得て3等分

・単培養 a) 群について髄核細胞、骨髄間葉系幹細胞ともに4日間DMEM/F-12培地にて単培養を行い、その後3日間カルチャーインサートを用いて髄核細胞と骨髄間葉系幹細胞を細胞間接着を伴う共培養を行う。b) 群、c) 群も同様に解凍後に上記単培養と細胞間接着を伴う共培養を行う。

・評価

- ① 細胞数、viabilityの測定 (凍結群の解凍時の状態を非凍結群と比較)
- ② MMT assay (培養7日終了後より、1、3、5日目に測定)
- ③ GAG/DNA (培養7日終了後に測定)
- ④ Aggrecan (培養7日終了後に測定)
- ⑤ コロニー形成 (培養7日終了後に測定)

(2) ヒト検体を用いた実験

・手術時に摘出したヒト髄核細胞 (n=10)、腸骨骨髄穿刺より得た骨髄液 (n=10) を使用

・髄核組織をA) 非凍結群、B) 酵素処理後の細胞凍結群 (凍結期間2週間)、C) 組織凍結群 (凍結期間2週間) に3等分

以下1)の動物実験と同様の処理を施行。

・単培養 A) 群について髄核細胞、骨髄間葉系幹細胞ともに4日間自家末梢血から採取した血清を加工して単培養を行い、その後3日間カルチャーインサートを用いて髄核細胞と骨髄間葉系幹細胞を細胞間接着を伴う共培養を行う。B) 群、C) 群も同様に解凍後に上記単培養と細胞間接着を伴う共培養を行う。

・評価

(1) の動物実験と同様の評価を行う。

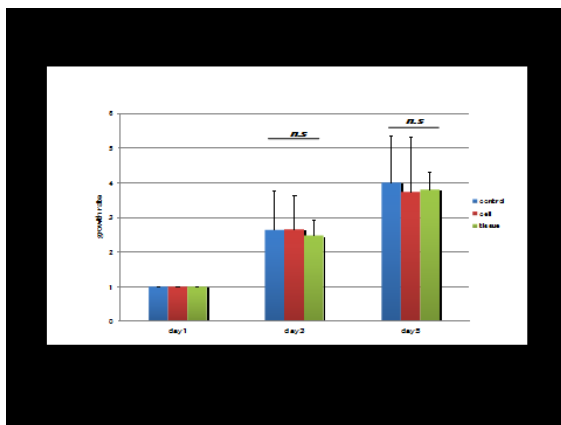
(3) 培養環境に関する検討実験

本研究では、変性が進行した椎間板内への細胞や組織移植の際に、移植を受ける側の状態がその移植の有効性を決定する上で重要な因子となることに着目し、移植をうける椎間板組織における酸素分圧の差異、栄養状態の差異によって、3群の活性化髄核細胞がどのような影響を受けるかについて検討する。手術時に摘出したヒト髄核細胞 (n=10)、腸骨骨髓穿刺より得た骨髓液 (n=10) を使用し、髄核組織を A) 非凍結群、B) 酵素処理後の細胞凍結群 (凍結期間 2 週間)、C) 組織凍結群 (凍結期間 2 週間) に 3 等分し、骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養の環境下で、高、中、低酸素分圧と培地内のグルコース供与の 3 段階との組み合わせで、各々 9 つの培養環境を作成し、活性化髄核細胞の質的、量的状態を検討した。

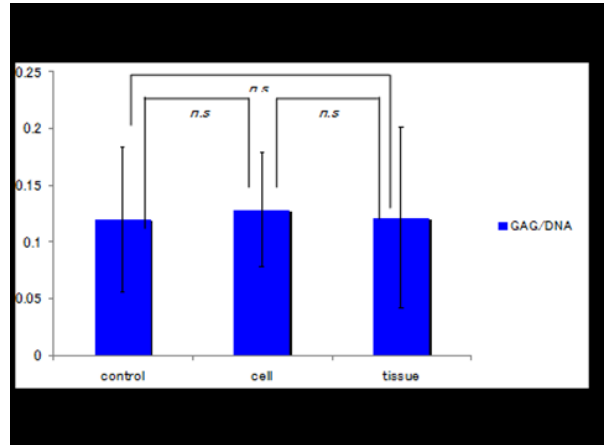
4. 研究成果

(1) 髄核細胞増殖能、基質合成能に a,b,c 各群に明らかな差はなかった。また、各群ともに染色体異常、腫瘍性病変は認められなかった。結論として細胞凍結では viability、細胞増殖能、基質合成能に明らかな差はなかった。

(2) A 群と比較して B 群は細胞の viability、細胞増殖能、基質合成能に明らかな差はなかった。C 群は A 群に比べて細胞の viability が $P < 0.05$ でごくわずかに劣っていた。また、非凍結群 (A 群)、凍結群 (B、C 群) ともに染色体異常、腫瘍性病変は認められず RT-PCR にて共に同様の遺伝子発現を示していた。結論として細胞凍結では viability、細胞増殖能、基質合成能に明らかな差はなく、今後細胞凍結による活性化髄核細胞移植の実現の可能性が示唆された。



MTT assay 3 群間に有意差は見られない
左から培養 1 日、3 日、5 日目
各棒グラフ (左: 通常の共培養、中: 髄核細胞の解凍後共培養、右: 髄核組織解凍後の共培養)



GAG/DNA 3 群間に有意差は見られない
(左: 通常の共培養、中: 髄核細胞の解凍後共培養、右: 髄核組織解凍後の共培養)

(3) 細胞数、viability の測定 (凍結群解凍時の状態を非凍結群と比較)、MMT assay、GAG/DNA、Aggrecan の 5 項目と 9 培養環境群間の関連の検討では、定量的な相関関係は統計学的に明らかとはならなかったが、高酸素分圧 + 中グルコース濃度以下の組み合わせの群が細胞活性化が量的、時間的な面から促進されないことが明らかとなった。以上より、変性のない椎間板腔内でみられる髄核中心部の無血管、低酸素濃度の環境は、髄核細胞にとって生理的な環境であることが示され、中等度までの変性椎間板に対する髄核細胞移植術の効率化を高める上で重要なデータが得られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, Iwashina T, Serigano K, Tamura F, Mochida J. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 査読あり Vol 28, 2010, 623-630

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tanaka M, Sakai D, Mochida J. Basic research on cryopreservation of activated human nucleus pulposus cells. ISSLS meeting at Gotenburg, Sweden 2011.6.27
- ② 田中真弘, 酒井大輔, 檜山明彦, 新井文臣, 中島大輔, 中井知子, 持田譲治. 活性化髄

核細胞の凍結保存方法についての基礎的
検討(第 2 報). 日本整形外科学会雑誌
85(8), S1072.2011.08.28

- ③ 田中真弘、酒井大輔、新井文征、持田讓
治. 活性化髄核細胞の凍結保存法につ
いての基礎的検討 第 25 回日本整形外
科学会基礎学術集会 2010 年 10 月 14 日
国立京都国際会館 (京都市)
- ④ 酒井大輔、田中真弘、新井文征、持田讓
治. 椎間板再生のための細胞移植療法
臨床研究の進捗および幹細胞研究による
新展開 第 25 回日本整形外科学会基礎
学術集会 2010 年 10 月 14 日 国立京都
国際会館 (京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

持田 讓治 (MOCHIDA JOJI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号 : 30129697

(2) 研究分担者

酒井 大輔 (SAKAI DAISUKE)
東海大学・医学部・講師
研究者番号 : 10408007

岩品 徹 (IWASHINA TOORU)
東海大学・医学部・助教
研究者番号 : 10433913
(H20)